

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TCC

TAÍSE DA SILVA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Florianópolis

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TCC

**AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE DIFERENTES AGENTES QUÍMICOS NA
REDUÇÃO DE COLÔNIAS DE *CANDIDA ALBICANS* EM AMOSTRAS DE
RESINA ACRÍLICA DE BASE DE PRÓTESE TOTAL: UM ESTUDO PILOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Odontologia da UFSC como requisito
para a conclusão do Curso de Graduação em
Odontologia.

Aluna: Taíse da Silva

Orientador: Prof. Dr. Luis André Mendonça
Mezzomo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gabriela Müller

Florianópolis

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Luis André Mendonça Mezzomo, pela enorme dedicação, à Dra. Gabriela Müller, pela disposição e acolhimento, ao Dr. Admir Giachini pela ajuda nos passos iniciais e à Dra. Luciana Rezende, pela solicitude. À UFSC, que possibilitou o ambiente de trabalho.

Sou grata à equipe do laboratório Atílio Cera, pois mantiveram o espaço e seus conhecimentos à minha disposição. Ao engenheiro aeronáutico da EMBRAER, Davi Henrique de Bianchi, pela grande agilidade e ajuda na análise dos dados.

Agradeço também ao meu namorado, companheiro e amigo, Gustavo Henrique Bregagnollo, que sempre esteve apoiando-me e incentivando-me durante todo o processo. Aos meus pais e irmão, que sempre acreditaram e estiveram comigo.

RESUMO

A estomatite protética (EP) é uma doença crônica multifatorial causada principalmente pelo fungo *Candida albicans*. Este pode ser combatido com o uso de agentes químicos higienizadores na manutenção caseira da prótese total. No entanto, existem poucas evidências na literatura sobre qual o agente químico mais eficaz na redução das colônias de *Candida albicans*. Assim, o objetivo deste estudo piloto foi avaliar a efetividade de três agentes químicos na redução de colônias de *Candida albicans* em amostras de resina acrílica de base de prótese total. Foram utilizados 12 corpos de prova com formato cilíndrico ($\varnothing 16\text{mm} \times 2,5\text{mm}$ espessura) esterilizados com óxido de etileno e divididos em grupos experimentais: Grupo Hip = hipoclorito ($n=3$); Grupo Clo = clorexidina ($n=3$); Grupo Bic = bicarbonato de sódio ($n=3$); e Grupo Ctrl = soro fisiológico ou controle ($n=3$). Os corpos de prova foram submersos em YPD (yeast extract peptone dextrose) caldo contendo a concentração de 1.10^6cels/mL de *Candida albicans*. Após o tempo de incubação, os corpos de prova foram depositados em tubos de ensaio autoclavados e lavados com solução salina. Em seguida, foram divididos em grupos e expostos aos agentes químicos por 5 minutos. Após, foi realizada uma nova lavagem e plaqueamento para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs). Os dados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente com os softwares Microsoft Excel® e Matlab®. As porcentagens da redução do número de colônias nos grupos, com relação ao seu respectivo grupo controle, foram: Hip1(R1)=100% Hip1(R2)=100% Hip1(R3)=100%; Hip2(R1)=100% Hip2(R2)=100% Hip2(R3)=100%; Hip3(R1)=ln Hip3(R2)=100% Hip3(R3)=100%; Clo1(R1)=99,999% Clo1(R2)=99,999% Clo1(R3)=99,999%; Clo2(R1)=100% Clo2(R2)=100% Clo2(R3)=100%; Clo3(R1)=100% Clo3(R2)=99,995% Clo3(R3)=99,960%; Bic1(R1)=99,974% Bic1(R2)=99,943% Bic1(R3)=99,972%; Bic2(R1)=ln Bic2(R2)=ln Bic2(R3)=ln; Bic3(R1)=ln Bic3(R2)=ln Bic3(R3)=ln. No tempo de exposição e na frequência testados, todos os agentes químicos foram efetivos na redução de colônias de *Candida albicans*. O hipoclorito de sódio e o gluconato de clorexidina foram igualmente efetivos e mostraram-se superiores ao bicarbonato de sódio.

Palavras-chave: estomatite protética, *Candida albicans*, hipoclorito de sódio, clorexidina, bicarbonato de sódio, prótese total, higienização química de dentaduras.

ABSTRACT

Denture-related stomatitis (DRS) is a multifactorial chronic disease mainly caused by the fungal specimen *Candida albicans*. This may be fought with the aid of hygiene chemical agents on the homemade maintenance of the complete denture. However, there is little evidence on the literature on the most effective chemical agent on the reduction of the colonies of *Candida albicans*. Thus, the aim of this pilot study was to assess the effectiveness of three chemical agents on the reduction of colonies of *Candida albicans* from samples of acrylic resin of complete denture basis. Twelve samples were used with a cylindrical shape ($\varnothing 16\text{mm} \times 2.5\text{mm}$ thick), sterilized with ethylene oxide and divided into the experimental groups: Group Hyp – 1% hypochlorite ($n=3$); group Clo ($n=3$); group Bic = sodium bicarbonate ($n=3$); and group Ctrl = saline or control ($n=3$). Samples were submerged into YPD soup containing the concentration of 1.10^6 cels/mL of *Candida albicans*. After the period of incubation, samples were placed into sterile test-tubes and washed with saline. Secondly, samples were divided into the groups and exposed to the chemical agents for 5 minutes. Lastly, new washing and plating have been performed to the counting of colony forming units (CFUs). Data were tabulated and statistically analyzed with the softwares Microsoft® Excel® and Matlab®. Percentage of candida CFU reduction relative his control group: Hip1(R1)=100% Hip1(R2)=100% Hip1(R3)=100%; Hip2(R1)=100% Hip2(R2)=100% Hip2(R3)=100%; Hip3(R1)=ln Hip3(R2)=100% Hip3(R3)=100%; Clo1(R1)=99,999% Clo1(R2)=99,999% Clo1(R3)=99,999%; Clo2(R1)=100% Clo2(R2)=100% Clo2(R3)=100%; Clo3(R1)=100% Clo3(R2)=99,995% Clo3(R3)=99,960%; Bic1(R1)=99,974% Bic1(R2)=99,943% Bic1(R3)=99,972%; Bic2(R1)=ln Bic2(R2)=ln Bic2(R3)=ln; Bic3(R1)=ln Bic3(R2)=ln Bic3(R3)=ln. Within the time of exposure and frequency tested, all the chemical agents were effective on the reduction of the colonies of *Candida albicans*. Sodium hypochlorite and chlorhexidine digluconate were equally effective and superior to the sodium bicarbonate.

Key-words: denture-related stomatitis, *Candida albicans*, sodium hypochlorite, chlorhexidine, sodium bicarbonate, complete denture, chemical hygiene of dentures.

LISTA DE ABREVIATURAS

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

EP – Estomatite Protética

Hip – Hipoclorito de sódio

Clo – Gluconato de Clorexidine

Bic – Bicarbonato de sódio

Ctrl – Controle

In – Incontáveis (número de UFC)

PT – Prótese Total

YPD - Yeast Peptone Dextrose

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtos utilizados na confecção dos corpos de prova.....	14
Figura 2. Processo de confecção dos corpos de prova.....	14
Figura 3. Duas placas de cultura com seis poços, com corpos de prova submersos em YPD caldo contaminado com <i>Candida albicans</i>	16
Figura 4. Placas de cultura com seis poços dentro da incubadora Shaker.....	16
Figura 5. Seqüência de plaqueamento utilizando-se a técnica de Pour-Plate.....	18

SUMÁRIO

Introdução	8
Revisão de literatura	9
Objetivo	11
Objetivo geral	11
Objetivo específico	11
Material e Método	11
Delineamento do estudo	11
Obtenção dos corpos de prova	11
Esterilização das amostras	15
Obtenção das colônias de <i>Candida albicans</i>	15
Inoculação das superfícies	15
Agentes desinfetantes	17
Delimitação dos grupos experimentais	17
Coleta de dados	17
Análise estatística	18
Resultados	19
Discussão	20
Conclusões	23
Orçamento	24
Referências	25

1. INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma doença crônica multifatorial, caracterizada por inflamação e uma área eritematosa na mucosa bucal. Devido à sua etiologia multifatorial, o tratamento é complexo. Apesar de ser frequente, ela geralmente é assintomática, sendo que poucas pessoas apresentam dor, prurido e queimação.¹ Alguns dos fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento dessa doença são baixa higiene,²⁻³ idade avançada, deficiências nutricionais, tabagismo, etilismo, hipossalivação e trauma,³ entre outros.

A superfície interna de uma prótese apresenta irregularidades e microporosidades da resina, o que facilita a colonização por bactérias e fungos. Dentre estes microrganismos, pode-se destacar a *Candida albicans*, pois ela é encontrada em 65% das estomatites protéticas, tornando-a o agente mais prevalente.⁴⁻⁶ Essa espécie fúngica pode ser combatida na manutenção caseira com o uso de agentes higienizadores, tais como hipoclorito de sódio,⁷ clorexidina,⁸ bicarbonato de sódio,⁹ ácido acético⁸ e sabão neutro.¹⁰

Alguns estudos sugerem que a estomatite protética está mais associada ao crescimento de cândida na base da dentadura que na mucosa,^{11,12} sendo, portanto, de suma importância a utilização de meios químicos para a higienização dessas próteses. Há estudos relatando que a escovação mecânica é efetiva na remoção do biofilme da *Candida albicans*;^{13,14} no entanto, a maior parte dos usuários de próteses totais removíveis são pessoas de idade avançada, fator que pode comprometer a qualidade da escovação mecânica, devido a uma relativa menor destreza manual.¹⁵ Por conta disso, a higienização química parece exercer um papel fundamental na correta limpeza das próteses totais, por se tratar de um método fácil, barato e disponível a todos os usuários.

Embora a higienização da prótese seja uma orientação importante a ser repassada a todos os usuários, ainda não existe na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) um protocolo bem estabelecido com relação a este procedimento. Além disso, existem poucas evidências na literatura que comparam a efetividade das

diferentes soluções higienizadoras disponíveis comercialmente na redução de colônias de *Candida albicans*. Desta forma, com este estudo, podemos contribuir na elaboração de um protocolo para utilização nas clínicas de Graduação da UFSC, assim como na rede de atenção básica à saúde de Florianópolis e região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A EP é uma patologia muito frequente dentre os usuários de próteses totais removíveis, atingindo até dois terços deles.⁶ Um grande estudo populacional denominado NHANES III pesquisou 33.994 indivíduos dos Estados Unidos, sendo que 20% eram usuários de próteses removíveis. Dentre os pesquisados, 28% possuíam estomatite protética. Dos 6.003 indivíduos com lesões na mucosa bucal, 1041 possuíam estomatite protética relacionadas à *Candida albicans*.¹⁶

A candidíase atrófica crônica se caracteriza por uma inflamação na região que suporta a prótese e uma placa esbranquiçada sobre a mucosa e a base da prótese. Outra manifestação comum é a candidíase eritematosa, caracterizada por pontos ou áreas eritematosas (Tipos I e II de Newton, respectivamente) na mucosa sob a base da prótese ou, ainda mais severa, por tecido granulo-eritematoso (Tipo III de Newton). A *Candida albicans* é um microrganismo que já faz parte da flora de pessoas saudáveis, sendo encontrada nos tratos gênito-urinário e gastrointestinal, inclusive cavidade bucal.¹⁷ Desta forma, a melhor maneira de evitar o acometimento dessa estomatite por *Candida* é a prevenção durante a manutenção caseira, por meio da higienização química e mecânica das próteses.

A higienização diária é aconselhada a todos. Entretanto, como os usuários são em maioria idosos e pode haver dificuldade de realizar a limpeza mecânica devido à menor destreza manual,¹⁵ a limpeza química pode ser um recurso auxiliar bastante efetivo nestes casos. Por esta razão, é recomendado ser feita escovação e imersão em soluções higienizadoras.^{13,18}

O hipoclorito de sódio é uma substância freqüentemente incluída nas pesquisas a respeito de soluções higienizadoras de próteses. Sua concentração a 1% se mostrou bastante efetiva na redução do biofilme de diversos microrganismos, inclusive o de *Candida albicans*.¹⁹ Segundo Pavarina et al. (2003),²⁰ o hipoclorito de sódio a 1% pode ser usado como uma solução de imersão para controle de infecções.

Outro agente desinfetante bastante estudado é o gluconato de clorexidina, por sua atividade contra microrganismos gram-positivos, gram-negativos, fungos, leveduras, anaeróbios facultativos e aeróbios. O uso de gluconato de clorexidina 0,2% previne a ocorrência de estomatite protética.²¹

As soluções comerciais limpadoras de dentadura são outro método de limpeza química de dentadura utilizado pelos usuários. Quando comparado com hipoclorito de sódio a 0,5%, o bicarbonato de sódio não obteve a mesma eficácia na redução do biofilme de *Candida albicans*; contudo, o resultado foi satisfatório.²²

Atualmente, poucas são as diretrizes publicadas a respeito da manutenção a longo prazo de próteses totais. Uma das mais recentes e completas foi publicada em 2011, por Felton et al. (2011).¹⁸ Dessas referidas diretrizes, as de maior interesse para este estudo, em tradução livre, são as seguintes:

A remoção diária cuidadosa do biofilme bacteriano presente na cavidade oral e nas dentaduras completas é de grande importância para minimizar as estomatites e ajudar a contribuir para uma boa saúde oral geral. Para reduzir os níveis de biofilme de bactérias e fungos potencialmente danosos, os pacientes que usam dentaduras devem seguir os seguintes passos: A. as dentaduras devem ser limpas diariamente, enxaguando e escovando com um limpador de dentadura efetivo e não abrasivo. B. os limpadores de dentadura devem somente ser usados para limpar dentaduras fora da boca. C. dentaduras devem sempre ser lavadas depois da imersão e escovação com as soluções higienizadoras antes de serem colocadas novamente na cavidade oral. Sempre seguir as instruções do produto. As dentaduras não devem ser imersas em alvejante hipoclorito de

sódio, ou em produtos que contenham hipoclorito de sódio, em períodos que excedam 10 min, pois podem danificar as dentaduras (Felton e cols. 2011, p S4).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a efetividade de diferentes agentes químicos na higienização de amostras de resina acrílica de base de prótese total.

3.2 Objetivo Específico

Avaliar a efetividade dos agentes hipoclorito de sódio 1%, gluconato de clorexidina 0,2% e bicarbonato de sódio na redução de colônias de *Candida albicans* em amostras de resina acrílica de base de prótese total.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

Este estudo tem um desenho experimental *in vitro*.

4.2 Obtenção dos corpos de prova

Foram utilizados 12 corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável para microondas cor rosa médio (VipiWave®, VIPI Artigos Odontológicos, São Paulo – SP) (Figura 1-a), modelados de acordo com um molde metálico criado especificamente para

este fim (Figura 2-a). Este molde constituiu-se em um disco de aço inoxidável (Ø78mm x 2mm de espessura), onde três perfurações (Ø16mm cada) foram confeccionadas com uma broca.

Esta etapa foi executada no Laboratório de Prótese Dentária Atílio Cera (Florianópolis, Brasil). Primeiramente, foram confeccionados padrões de silicone de condensação (Zetalabor®, Zhermack®, Badia Polesine, Itália) (Figura 1-b), misturando a pasta e o catalisador, conforme orientações do fabricante. O material, ainda na fase plástica, foi inserido no interior das perfurações do molde metálico, sobre uma placa de vidro. Uma outra placa de vidro lisa foi utilizada para cobrir o conjunto molde-silicone e regularizar a superfície (Figura 2-b). Após a vulcanização do material, os padrões de silicone foram retirados e os excessos removidos com lâmina de bisturi (Figura 2-c). Os padrões, em número de oito, foram então posicionados sobre gesso pedra tipo III (Asfer®, Asfer Indústria Química, São Paulo) (Figura 1-c), no interior de uma mufla metálica nr. 6 (Figura 2-d), e colados com cianocrilato (SuperBonder®, Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil).

Após o tempo de cristalização do gesso (± 40 minutos), foi aplicada uma camada de isolante para gesso (Cel-Lac®, SS-White, Rio de Janeiro) sobre o gesso e os padrões de silicone da mufla. A contramufla foi completamente preenchida com gesso pedra tipo III e fechada sobre a mufla (Figura 2-e). Depois do segundo tempo de cristalização do gesso (± 40 minutos), a mufla e a contramufla foram separadas e os padrões de silicone foram retirados, deixando impressões no gesso da contramufla. Estes espaços (impressões no gesso) foram injetados com resina acrílica termopolimerizável para microondas cor rosa médio (VipiWave®, VIPI Artigos Odontológicos, São Paulo – SP), a mesma utilizada para a confecção de bases de prótese total. Em seguida, foi colocada uma película de papel celofane sobre o conjunto contramufla-resina-gesso, e a mufla foi novamente fechada. Esta, então, foi levada à prensa hidráulica com pressão de uma tonelada (Figura 2-f).

Com a mufla aberta, os excessos de resina foram retirados. O conjunto foi novamente fechado e levado à prensa, com pressão de uma tonelada por 30 minutos. A seguir, a mufla foi levada ao microondas por vinte minutos em potência de 220W e então por mais cinco minutos a 660W para realizar o processo de polimerização. Após o esfriamento e com as amostras em temperatura ambiente, elas foram retiradas da mufla (Figura 2-g) e, com uma broca de tungstênio tipo maxicut foram removidas as imperfeições mais grosseiras (Figura 2-h). A última etapa da obtenção dos corpos de prova foi o polimento com lixas d'água de granulações regressivas (nrs. 80, 120, 150, 220, 280 e 360) (Figura 1-d), e finalizado com discos de feltro com água e pedra-pomes/branco de Espanha em pó. Este processo de acabamento reproduz com fidelidade o processo de polimento aplicado nas bases de próteses totais. A outra face das amostras foi polida apenas com lixa d'água de granulação 80 a fim de promover uma superfície rugosa padronizada, de aproximadamente 2 μ m, para facilitar a aderência das colônias de *cândida* na superfície acrílica.²³ O processo foi repetido, até a obtenção do total de amostras calculado no projeto ($n=12$). Os corpos de prova, de 16mm de diâmetro por aproximadamente 2mm de espessura (Figuras 2-i, 2-j e 2-k), foram então armazenados em caixas de plástico até o momento da esterilização.



Figura 1. Produtos utilizados. a) Resina acrílica termopolimerizável para micro-ondas; b) Silicone de condensação; c) Gesso pedra tipo III; d) Lixas d'água.

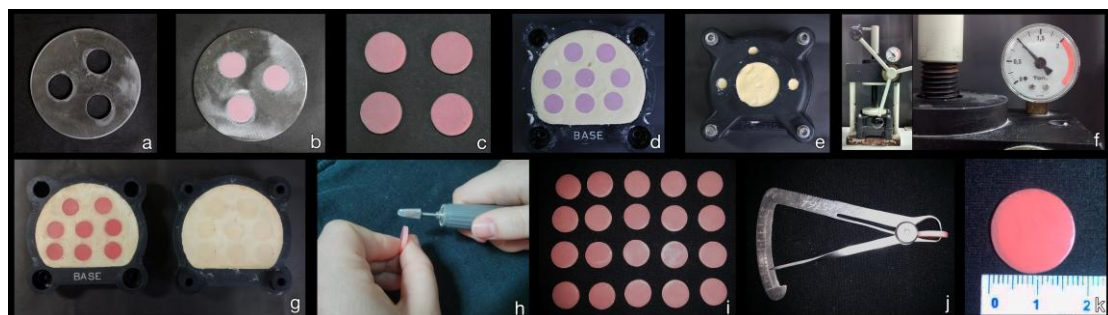


Figura 2. Processo de confecção dos corpos de prova. a) Molde metálico em aço inox; b) Moldes preenchidos com silicone de condensação; c) Padrões em silicone de condensação; d) Mufla com gesso e padrões de silicone colados com cianocrilato; e) Mufla fechada e totalmente vazada com gesso; f) Prensa com pressão de 1 tonelada; g) Mufla e contramufla separadas com amostras prontas em resina acrílica na mufla e impressões dos padrões de silicone marcadas no gesso na contramufla; h) Acabamento e polimento das amostras; i) Amostras em resina acrílica prontas; j) Espessura das amostras aferidas com espessímetro; k) diâmetro das amostras acrílicas.

4.3. Esterilização das amostras

Em razão de as amostras tratarem-se de material termossensível, a etapa seguinte foi submetê-las à esterilização com óxido de etileno, realizada por uma empresa privada (Hospitec®, São José, Santa Catarina, Brasil).

4.4 Obtenção das colônias de *Candida albicans*

As colônias de *Candida albicans* foram cedidas pelo Serviço de Microbiologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago.

4.5 Inoculação das superfícies

A etapa da análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina. Um tubo de ensaio foi inoculado com uma alçada de *Candida albicans* em 4mL de YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) caldo e levado a uma incubadora refrigerada Shaker (Marconi®, Piracicaba, Brasil), a 37°C e sob agitação de 120rpm, por 48 horas. Em seguida, foi feita a leitura da cultura em Densidade Ótica (DO) no espectrofotômetro (3B Scientific®, Hamburgo, Alemanha), com comprimento de onda de 670nm, cuja faixa de leitura é de 0,03 a 0,3nm. Para realizar a leitura, foi preciso diluir a amostra em solução salina 20 vezes. Os 4mL da cultura no tubo de ensaio apresentaram $6,9 \times 10^7$ cels/mL e foram diluídos novamente com YPD caldo estéril a fim de atingir volume de 50mL com concentração de 1.10^6 cels/mL. A seguir, os 12 corpos de prova foram depositados em 12 poços de duas placas de cultura, com seis poços cada (Figura 3). Em cada poço, contendo uma amostra, foi depositado 4mL de solução YPD caldo (concentração de 1.10^6 cels/mL; total = 4.10^6 cels/mL), cobrindo totalmente as amostras. As placas foram então levadas para incubadora refrigerada Shaker, sob agitação de 75rpm a 37°C, por 16 horas (Figuras 4-a e 4-b).

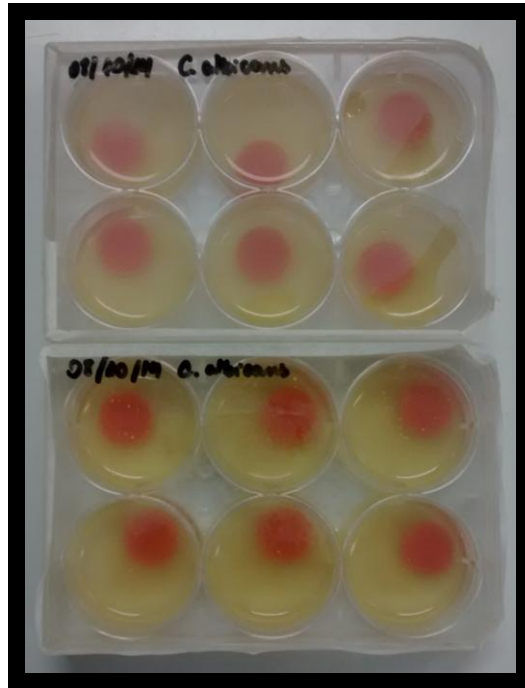


Figura 3. Duas placas de cultura com seis poços, onde cada um contém um corpo de prova imerso em YPD caldo contendo $1 \cdot 10^6$ cels/mL ($1 \times 10^6 = 1.000.000$ de células). Como foram depositados 4mL, o total de células de *Candida albicans* foi de 4.000.000 (ou 4×10^6).

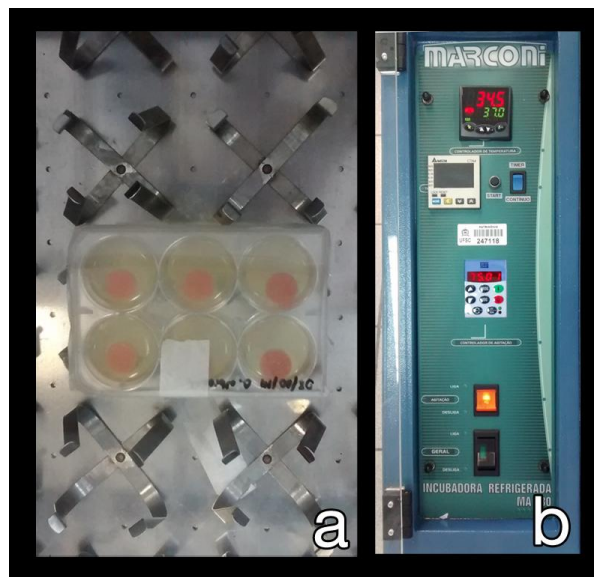


Figura 4. a) placas de cultura de seis poços contendo corpos de prova dentro da incubadora Shaker; b) programação da incubadora Shaker.

4.6 Agentes desinfetantes

Os agentes químicos pesquisados neste trabalho foram: hipoclorito de sódio 1% (Ciclofarma®, Serrana-SP, Brasil) puro, gluconato de clorexidine 0,2% puro (Rioquímica®, São José do Rio Preto – SP, Brasil) e bicarbonato de sódio (Corega Tabs® - Block Drug Co., Jersey City – Nova Jersey, Estados Unidos) diluído em 200ml de solução salina. O grupo controle, por sua vez, foi exposto à solução neutra de cloreto de sódio a 0,85% (soro fisiológico).

4.7 Delimitação dos Grupos Experimentais

Os corpos de prova contaminados foram colocados em tubos de ensaio, devidamente rotulados, divididos em 4 grupos (Tabela 1): Grupo Hip = hipoclorito; Grupo Clo = clorexidina; Grupo Bic = bicarbonato de sódio; e Grupo Ctrl = solução salina 0,85% ou controle.

Tabela 1. Divisão dos corpos de prova, de acordo com os agentes químicos.

AGENTE QUÍMICO	TEMPO	GRUPO	<i>n</i>
Hipoclorito de sódio 1%	5 minutos	Grupo Hip	<i>n</i> = 3
Gluconato de clorexidine 0,2%	5 minutos	Grupo Clo	<i>n</i> = 3
Bicarbonato de Sódio	5 minutos	Grupo Bic	<i>n</i> = 3
Solução cloreto de sódio 0,85% (Controle)	5 minutos	Grupo Ctrl	<i>n</i> = 3
TOTAL			12

4.8 Coleta de dados

Após 16 horas da cultura na incubadora Shaker, os corpos de prova foram depositados em tubos de ensaio previamente esterilizados e etiquetados. Todos os corpos de prova foram submetidos separadamente a uma sequência de três lavações

com solução isotônica para a retirada das células que ainda não tinham sido mortas. De acordo com a divisão dos grupos, cada corpo de prova foi imerso em 3mL de seu agente químico correspondente durante cinco minutos. Após esse tempo, o agente foi retirado e então foi realizada uma nova lavagem com solução isotônica. Depois da lavagem, foi depositado 1mL de solução salina no tubo de ensaio contendo o corpo de prova e esse conjunto levado ao sonificador por 30 segundos na frequência de 40 kHz e 120W. Em seguida, o conteúdo de cada tubo de ensaio foi plaqueado (Figura 5) em três placas de Petri estéreis utilizando o método *Pour-Plate* (plaqueamento em profundidade) e todas as placas foram para a incubadora a 28°C por três dias. Ao final do período, foi feita a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) nas placas de cada grupo e os dados foram tabulados.



Figura 5. Sequência de plaqueamento utilizando método *Pour-Plate*. a) Nomeando as placas com códigos dos grupos; b) Distribuindo conteúdo do tubo de ensaio em placas de Petri; c) Adicionando YPD ágar estéril; d) Homogeneização; e e) Placa de Petri pronta para levar à incubadora.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente utilizando o software Microsoft® Excel® 2013. As diferenças entre as médias foram calculadas através do teste *t* de Student unicaudal para amostras pareadas, entre os agentes e o controle, pelo software Matlab® (MathWorks, Natick, EUA). Um nível de significância de 5% foi estabelecido.

5. RESULTADOS

A contagem de UFCs após a exposição dos corpos de prova de resina acrílica de base de prótese total aos diferentes agentes químicos e às sucessivas lavagens está representada na Tabela 2:

Tabela 2. Contagem das Unidades Formadoras de Colônia em cada grupo do estudo após a exposição aos agentes químicos e aos processos de lavagem.

Agente [§]	Inoculação inicial no YPD caldo (cel/mL)	Contagem de UFCs Repetição 1	Contagem de UFCs Repetição 2	Contagem de UFCs Repetição 3
Hip 1	4,0 x 10 ⁶	0 (100%)**	0 (100%)**	0 (100%)**
Hip 2	4,0 x 10 ⁶	0 (100%)**	0 (100%)**	0 (100%)**
Hip 3	4,0 x 10 ⁶	In*	0 (100%)**	0 (100%)**
Clo 1	4,0 x 10 ⁶	1 (99,999%)**	1 (99,999%)**	1 (99,999%)**
Clo 2	4,0 x 10 ⁶	0 (100%)**	0 (100%)**	0 (100%)**
Clo 3	4,0 x 10 ⁶	0 (100%)**	4 (99,995%)**	32 (99,960%)**
Bic 1	4,0 x 10 ⁶	86 (99,974%)**	57 (99,943%)**	49 (99,972%)**
Bic 2	4,0 x 10 ⁶	In*	In*	In*
Bic 3	4,0 x 10 ⁶	In*	In*	In*
Ctrl 1	4,0 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵
Ctrl 2	4,0 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵
Ctrl 3	4,0 x 10 ⁶	0,7 x 10 ⁵	0,8 x 10 ⁵	0,8 x 10 ⁵

[§] Hip – Grupo exposto a Hipoclorito de sódio 1%; Clo – Grupo exposto a Gluconato de Clorexidine 0,2%; Bic – Grupo exposto a Bicarbonato de sódio; Ctrl – Grupo controle.

*In – Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) inviável. ** Porcentagem da redução das colônias de *Candida albicans* com relação ao respectivo grupo controle

As amostras dos Grupos Hip (hipoclorito) e Clo (clorexidine) tiveram uma redução estatisticamente significativa das unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Candida albicans* quando comparadas às amostras do Grupo Ctrl ($p < 0,05$). Este resultado não foi encontrado apenas com a amostra Hip 3 ($p = 0.211$). A amostra Bic1, do grupo exposto ao agente químico bicarbonato de sódio, também mostrou uma redução estatisticamente significativa na contagem de UFCs ($p = 0.049$). No entanto, este mesmo resultado não foi encontrado com as amostras Bic2 e Bic3, do mesmo grupo. As comparações entre os grupos dos diferentes agentes químicos estão expostas na Tabela 3:

Tabela 3. Comparação entre os grupos de exposição a agentes químicos com o grupo controle, com relação à redução do número de colônias de *Candida albicans*.

Agente[§] x Grupo controle	p	Nível de confiança
Hip 1 x Ctrl 1	0.049*	95,0%
Hip 2 x Ctrl 2	0.004*	99,5%
Hip 3 x Ctrl 3	0.211	78,8%
Clo 1 x Ctrl 1	0.049*	95,0%
Clo 2 x Ctrl 2	0.004*	99,5%
Clo 3 x Ctrl 3	0.0009*	99,9%
Bic 1 x Ctrl 1	0.049*	95,0%
Bic 2 x Ctrl 2	1	0%
Bic 3 x Ctrl 3	1	0%

[§] Hip – Grupo exposto a Hipoclorito de sódio 1%; Clo – Grupo exposto a Gluconato de Clorexidina 0,2%; Bic – Grupo exposto a Bicarbonato de sódio; Ctrl – Grupo controle.

* Estatisticamente significante.

6. DISCUSSÃO

Este estudo experimental *in vitro* comparou três agentes comuns de limpeza e desinfecção - hipoclorito de sódio 1%, gluconato de clorexidina 0,2% e bicarbonato de sódio. A simulação de um cenário clínico foi aproximada, em que amostras de resina acrílica termopolimerizável empregadas na confecção de bases de prótese total foram inoculadas com *Candida albicans* e submetidas a um ciclo de higienização química. Os resultados mostraram que todos os agentes testados mostraram-se efetivos na redução do biofilme de *Candida albicans*, porém com uma superioridade para os agentes hipoclorito de sódio 1% e gluconato de clorexidina 0,2%.

Dentre os três agentes estudados, o hipoclorito de sódio e o gluconato de clorexidina tiveram resultados semelhantes quanto à redução do número de colônias de *Candida*. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de ambos os agentes químicos terem sido utilizados na forma pura (100%), ou seja, sem diluição alguma. Por exemplo, o hipoclorito mostrou-se capaz de remover 100% das colônias nos grupos Hip 1, Hip 2 e nas repetições 2 e 3 do grupo Hip 3. Comparando-se os grupos Hip 1 e Ctrl 1, a redução apresentou resultados tão consistentes quanto à comparação entre os grupos

Hip 2 e Ctrl 2. Devido ao resultado discordante da Repetição 1 do grupo Hip 3, a comparação entre Hip 3 com Ctrl 3 não mostrou resultados estatisticamente significante na redução das colônias de *Candida albicans*. Isto pode ter ocorrido devido a uma possível contaminação da amostra Hip 3, o que inviabilizou a contagem de UFCs. Apesar disso, a imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos mostrou-se efetiva na redução do biofilme fúngico, resultado concordante com outros estudos comparativos dessa substância,^{19,20,27} embora estes estudos tenham utilizado tempo de exposição e concentrações diferentes. Evidências na literatura apontam o hipoclorito de sódio 5-25% como sendo, inclusive, efetivo contra o vírus da hepatite,²⁸ fato a ser considerado na elaboração de um protocolo de higienização de uma clínica odontológica universitária. Desta forma, o hipoclorito parece opção viável para limpeza de uma PT, visto que, em média, seu custo de utilização é menor quando comparado com a clorexidina e com algumas soluções comerciais.

O gluconato de clorexidine 0,2% também apresentou redução estatisticamente relevante das colônias de *Candida* nos testes com tempo de exposição de cinco minutos. Este estudo mostrou redução importante do número de colônias em todos os testes quando comparado ao grupo controle. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Andrade et al. (2012),²⁹ que conduziu um estudo de exposição dos corpos de prova ao mesmo agente por cinco minutos, mas com concentração a 2%. Ainda no referido estudo, a clorexidina também foi efetiva na remoção do biofilme em concentração de 0,12% e 20 minutos de exposição. A clorexidina, por ser substância acessível em meio universitário, pode ser alternativa ao hipoclorito de sódio na higienização de PT. Devido ao maior custo relativo, possivelmente não seria a primeira escolha ao orientar um paciente sobre higienização química de sua prótese.

O grupo exposto por cinco minutos ao bicarbonato de sódio (Grupo Bic) mostrou-se não efetivo na redução das colônias de *Candida albicans* em dois dos três testes conduzidos. O grupo Bic 1, contudo, evidenciou resultado oposto, ou seja, foi efetivo quando comparado ao grupo Ctrl 1. Uma possível razão para o resultado discordante

dos grupos Bic 2 e Bic 3 tenha sido a diluição do produto em solução salina. Além do mais, é provável que este achado tenha relação com o tempo relativamente reduzido de exposição (5 minutos). Rossato et al. (2011)³⁰ testou o mesmo fabricante com dois tempos de exposição, de cinco e trinta minutos, e concluiu que havia necessidade de 30 minutos de imersão para atingir resultados semelhantes ao hipoclorito alcalino. Esta conclusão corrobora os nossos achados e evidencia a importância do tempo de exposição da amostra ao bicarbonato de sódio.

O principal agente causador da EP é a *Candida albicans*.^{4,6} Esse fungo pode se aderir a diversos materiais, como cateteres ou dentaduras.²⁴ Seu biofilme é tipicamente formado por uma camada de células leveduriformes, que se adere à superfície, e outra de células filamentosas, formando as hifas circundadas por matriz exopolimérica.²⁵ Os biofilmes formados em material de dentadura (polimetilmetacrilato) são mais finos que aqueles formados em elastômero de silicone, usados em cateteres.²⁵ Estes são compostos principalmente por células filamentosas, enquanto que os primeiros são formados principalmente por células leveduriformes. O desenvolvimento do biofilme é um dos principais fatores de resistência da *Candida* aos agentes antimicrobianos.²⁶

Com a adoção de um protocolo de higienização é possível padronizar a orientação dada aos pacientes das clínicas odontológicas da UFSC com relação ao método de limpeza de suas próteses mais apropriado. Para estabelecer um protocolo, é necessário que ele seja, além de efetivo na redução do biofilme, de fácil compreensão e execução. A necessidade de haver facilidade na compreensão e execução da técnica empregada deve-se ao fato de que a maioria dos usuários de PT são idosos e, portanto possuem menor destreza manual.¹⁵ Desta forma, neste estudo optou-se por submeter os corpos de prova aos agentes apenas por imersão, ou seja, sem escovação manual prévia, apesar de haver recomendação na literatura da combinação das duas técnicas.^{13,18} Da mesma forma, para facilitar a execução do protocolo, optou-se por um tempo de exposição reduzido (5 minutos), pois, com isso, há tentativa de reduzir o número de esquecimento da PT na solução ou adiamento da higienização. Cinco

minutos é, ainda, o mesmo tempo recomendado pelo fabricante do bicarbonato de sódio utilizado. Além desses, Felton *et al.* (2011)¹⁸ recomendam que as PT não sejam expostas ao hipoclorito de sódio por mais de dez minutos. Um dos principais objetivos da higienização química das próteses removíveis é reduzir o biofilme de *Candida albicans*. No entanto, vale destacar que, embora os agentes mostrem-se efetivos, a higienização química deve ser utilizada sempre em combinação com os métodos convencionais de higienização mecânica. Neste estudo, a higienização mecânica não foi simulada, em razão da dificuldade de reprodução das variações do indivíduo portador de prótese total, como destreza manual, intensidade de força, inclinação, tempo e padrão de movimentos, entre outros.

Mais estudos experimentais, com outros agentes químicos, uma amostra maior, tempos e frequência de exposição variados, combinando ou não com a higienização mecânica, são necessários para fornecer evidências para a elaboração de um método seguro, efetivo, de baixo custo e de fácil acesso para a redução de colônias de *Candida albicans* e, conseqüentemente, da prevalência de Estomatite Protética (EP).

7. CONCLUSÕES

Diante das limitações deste estudo experimental *in vitro*, é possível concluir que:

1. No tempo de exposição testado, os agentes Hipoclorito de Sódio 1% e Gluconado de Clorexidine 0,2% apresentaram-se igualmente efetivos na redução do número de colônias de *Candida albicans*;
2. O bicarbonato de sódio não apresentou resultados consistentes quanto à redução do número de colônias de *Candida albicans*, sendo efetiva no grupo Bic 1 e inefetiva nos grupos Bic 2 e Bic 3.
3. Ambos agentes, Hipoclorito de Sódio 1% e Gluconato de Clorexidine 0,2% mostraram resultados superiores ao bicarbonato de sódio.

8. ORÇAMENTO

Descrição	Fabricante	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Resma de papel A4	Report®	1	15,00	15,00
Cartucho preto de impressora LED Xerox Phaser 6000B	Xerox®	1	160,00	160,00
Resina acrílica termopolimerizável pó 2,250Kg	Vipi®	1	150,00	150,00
Resina acrílica termopolimerizável Líquido 1L	Vipi®	1	65,00	65,00
Silicone de Condensação	Zetalabor®	1	160,00	160,00
Gesso pedra tipo III 1Kg	Asfer®	1	4,00	4,00
Pote de plástico	Plasutil®	1	30,00	30,00
Esterilização com Óxido de Etileno	Parceria com HU	-	0	0
Hipoclorito de sódio 1% 5L	CicloFarma®	1	11,00	11,00
Gluconato de clorexidina 2% 1L	Rioquímica®	1	20,00	20,00
Placa de petri em poliestireno, estéril, 35 x 100mm	Santa Cruz®	200	0,60	120,00
Placa de cultura com 6 poços	Santa Cruz®	12	6,00	72,00
Corega Tabs Caixa	Corega®	1	20,00	20,00
Encadernação simples	-	3	4,00	12,00
Encadernação capa dura	-	1	30,00	30,00
Fotocópias	-	100	0,10	10,00
			Total:	879,00

REFERÊNCIAS

- 1- BUDTZ-JORGENSEN, E. Clinical aspects of Candida infection in denture wearers. **The Journal of the American Dental Association**. Chicago, p. 474-479. mar. 1978.
- 2- KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **Journal of Oral Rehabilitation**. Oxford, p. 300-304. mar. 2002.
- 3- GENDREAU, L. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. **Journal of Prosthodontics**. Philadelphia, p. 251-260. jun. 2011.
- 4- BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; STENDERUP, A. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. **Community Dent Oral Epidemiol**. Copenhagen, p. 115-119. abr. 1975.
- 5- BUDTZ-JORGENSEN, E. The significance of Candida albicans in denture stomatitis. **Scandinavian Journal of Dental Research**. Copenhagen, p. 151-190. abr. 1974.
- 6- ARENDORF, T. Denture stomatitis: a review. **Journal of Oral Rehabilitation**. Oxford, p. 217-227. maio 1987.
- 7- BARNABÉ, W.; MENDONÇA NETO, T.; PIMENTA, F.C.; PEGORARO, L.F. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, Streptococcus mutans and Candida albicans. **Journal Of Oral Rehabilitation**. Oxford, p. 453-459. Jul. 2004.
- 8- HUH, J.-B.; LIM, Y.; YOUN, H.-I.; CHANG, B.M.; LEE, J.-Y.; SHIN, S.W. Effect of denture cleansers on Candida albicans biofilm formation over resilient liners. **The Journal Of Advanced Prosthodontics**. Seul, p. 109-114. jun. 2014.
- 9- KUMAR, M.N.; THIPPESWAMY, H.M.; SWAMY, K.N.R.; GUJJARI, A.K. Efficacy of commercial and household denture cleansers against Candida albicans adherent to acrylic denture base resin: an in vitro study. **The Indian Journal of Dental Research**. Nova Deli, p. 39-42, jan. 2012.
- 10- PARANHOS, H.F.O.; SALLES, A.E.S.; MACEDO, L.D.; SILVA-LOBATO, C.H.; PAGNANO, V.O.; WATANABE, E. Complete Denture Biofilm after Brushing with Specific Denture Paste, Neutral Soap and Artificial Saliva. **Brazilian Dental Journal**. Ribeirão Preto, p. 47-52. 01 jan. 2013.
- 11- VAN REENEN, J. Microbiologic studies on denture stomatitis. **Journal of Prosthetic Dentistry**. St. Louis, p. 493-505. out. 1973.
- 12- BAHN, A; QUILLMAN, P; KENDRICK, F. Intraoral localization of micro-organisms. **Journal of Dental Research**. Copenhagen, p. 715-715. maio 1962.
- 13- PELIZZARO, D; POLYZOIS, G; MACHADO, A. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing *in vitro* Candida albicans biofilm viability. **Brazilian Dental Journal**. Ribeirão Preto, p. 547-554. set. 2012.
- 14- PARASKEVAS, S; ROSEMA, N.; VERSTEEG, P. The additional effect of a dentifrice on the instant efficacy of toothbrushing: a crossover study. **Journal of Periodontology**. Indianapolis, p. 1011-1016. jun. 2007.
- 15- BUDTZ-JORGENSEN, E. Materials and methods for cleaning dentures. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. St. Louis, p. 619-623. dez. 1979.
- 16- SHULMAN, J.D.; et al. The prevalence of oral mucosal lesions in U.S. adults: Data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Journal of American Dental Association**. Chicago, p. 1279-1286. set. 2004.
- 17- HENMING, M.M.. La prótesis odontológica, en relación a la ecología de Candida albicans en cavidad bucal. 1993. 66 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Universidade Central da Venezuela, Caracas, 1993.
- 18- FELTON, D; COOPER, L.; DUQUM, I.; MINSLEY, G.; GUCKES, A.; HAUG, S.; MEREDITH, P.; SOLIE, C.; AVERY, D.; CHANDLER, N.D. Evidence-based

- guidelines for the care and maintenance of complete dentures. **Journal of American Dental Association**. Chicago, p. 1s-20s. fev. 2011.
- 19- BEYERLE, M.P.; et al. Immersion disinfection of irreversible hydrocolloid impressions with sodium hypochlorite: Part I: Microbiology. **The International Journal of Prosthodontics**. Lombard, p. 234-238. maio 1994.
- 20- PAVARINA, A.C.; et al. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. **Journal of Oral Rehabilitation**. Oxford, p. 532-536. maio 2003.
- 21- SILVA, R.; SEIXAS, Z.A. Materiais e métodos de higienização para próteses removíveis. **International Journal of Dentistry**. Cairo, p. 125-132. abr. 2008.
- 22- FERNANDES, F.S.F.; et al. Efficacy of denture cleansers on *Candida* spp. biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. St Louis, p. 51-58. jan. 2011.
- 23- QUIRYNEN, M.; et al. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. **Journal of Clinical Periodontology**. Kansas City, p. 138-144. mar. 1990.
- 24- KOJIC, E.M., DAROUICHE, R.O.; *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington DC, p. 255-267. Abr. 2004
- 25- CHANDRA J., KUHN D.M., MUKHERJEE P.K., HOYER L.L., MCCORMICK T., GHANNOUM M.A.; Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**. Washington DC, p. 5385-5394. Set. 2001
- 26- KUMAMOTO, C.A.; *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**. New York, p. 608-611
- 27- FERNANDES, S. F. F. ; et al. Efficacy of denture cleansers on *Candida* spp. biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. **Journal of Prosthetic Dentistry**. St. Louis. p. 51-58. jan. 2011
- 28- RUDD, R.W.; SENIA, E.S.; MCCLESKEY, F.K.; ADAMS, E.D.; Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. **Journal of Prosthetic Dentistry**. St. Louis, p. 318. fev. 1984
- 29- ANDRADE, Ingrid Machado de et al. Effect of Chlorhexidine on Denture Biofilm Accumulation. **Journal Of Prosthodontics**. Philadelphia, p. 2-6. fev. 2012.
- 30- ROSSATO, Marisa Bagiotto et al. Analysis of the Effectiveness of Different Hygiene Procedures Used in Dental Prostheses. **Oral Health & Preventive Dentistry**. Berlin, p. 221-227. dez. 2011.